

501,065

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



09 JUL 2004



(43) Date de la publication internationale
24 juillet 2003 (24.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/059053 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A01K 67/027

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00064

(22) Date de dépôt international :
10 janvier 2003 (10.01.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/00268 10 janvier 2002 (10.01.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 145, rue de l'Université,
F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **CHESNE,**
Patrick [FR/FR]; 12, square Delacroix, F-78960 Voisins
le Bretonneux (FR). **ADENOT, Pierre** [FR/FR]; 6, rue
de Savigny, F-91390 Morsang sur Orge (FR). **RENARD,**
Jean-Paul [FR/FR]; 72, Rue Julien, F-92170 Vanves (FR).

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; 20, rue de
Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: RABBIT NUCLEAR CLONING METHOD AND USES THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE CLONAGE NUCLEAIRE CHEZ LE LAPIN ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing non-human mammal embryos, in particular rabbit by nuclear cloning.
The invention also concerns the mammals obtained and their uses.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode de production d'embryons de mammifères non humains, notamment de
lapin par clonage nucléaire. L'invention concerne également les mammifères obtenus et leurs utilisations.

WO 03/059053 A2

Procédé de clonage nucléaire chez le lapin et utilisations

5 La présente invention se rapporte à un procédé de clonage nucléaire de vertébrés, notamment de mammifères, et plus particulièrement de lapin. L'invention se rapporte également aux animaux ainsi produits, notamment des lapins, au stade fœtal ou
10 adulte, ainsi qu'à leur utilisation pour la production de molécules d'intérêt ou comme modèles animaux d'étude de pathologies humaines.

 Le lapin est de plus en plus considéré dans l'industrie biotechnologique pour les avantages qu'il
15 procure par rapport aux autres espèces animales. Tout d'abord, d'un point de vue phylogénique, le lapin est plus proche des primates, c'est-à-dire de l'homme, que les rongeurs, souris et rats, couramment utilisés à l'heure actuelle (Graur et al., 1996). Ensuite, le
20 lapin est mieux adapté aux manipulations physiologiques de par sa taille, contrairement aux animaux de petites tailles tels les rongeurs, souris et rat, ou les animaux de grande taille, tels les vaches, chèvres, brebis, porcs etc... . Enfin la taille importante des
25 portées et une reproduction rapide sont autant d'atouts pour un animal de laboratoire destiné à l'étude de pathologies humaines ou à la production de protéines recombinantes d'intérêt. Ainsi par exemple, le modèle lapin est d'un grand intérêt pour l'élaboration d'un
30 traitement clinique de l'artériosclérose (Hoeg et al., 1996) et de la mucoviscidose (Chen et al., 2001).

Le transfert nucléaire somatique associé à des modifications génétiques des cellules donneuses de noyaux pourrait rendre extrêmement intéressante l'utilisation du lapin comme animal de laboratoire (Fan et al., 1999) qui pour l'heure est confiné à la production de protéines recombinantes d'intérêt en large quantité (Stinnackre et al., 1997). La technologie de transfert nucléaire est très intéressante car elle permet la production rapide d'un grand nombre d'animaux génétiquement identiques, ou de leurs descendance, ayant des caractéristiques génétiques particulières. Cependant, à ce jour, le transfert nucléaire chez le lapin n'a jamais pu être mis en œuvre avec succès (Yin et al., 2000 ; Dinnyés et al., 2001) malgré le rôle pionnier du lapin dans les expériences de mise au point de la technologie de clonage nucléaire (Bromhall et al., 1975).

Un seul laboratoire de recherche a pu obtenir des débuts de gestations d'embryons à partir de noyaux de cellules somatiques (Yin et al., 2000), mais de manière surprenante aucune de ces gestations n'a pu atteindre leur terme.

Le lapin, pourtant utilisé initialement comme modèle animal pour la mise au point des techniques de transfert nucléaire (Bromhall et al., 1975) apparaît donc comme une espèce pour laquelle les technologies de clonage nucléaire existantes, qui ont données des succès avec d'autres espèces tels le mouton (Wilmut et al., 1997 ; WO 97 07669), la souris (Wakayama et al., 1998 ; WO 99 37143), les bovins (Wells et al., 1999), la chèvre (Baguisi et al., 1999 ; WO 00 25578), le porc (Polejaeva et al., 2000), ne sont pas adaptées. Il

existe donc un grand besoin de développer un nouveau procédé de clonage nucléaire d'espèces animales qui jusqu'à présent ne peuvent être clonées avec efficacité par les méthodes de transfert nucléaire actuellement disponibles, et notamment de développer un procédé de clonage nucléaire chez le lapin, qui soit à la fois efficace, reproductible et qui permettent d'obtenir de bon rendement de clonage.

C'est le problème que se propose de résoudre la présente invention en fournissant un procédé de production d'embryons de mammifères comprenant les étapes suivantes :

(a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de même espèce et du même âge :

- le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;
- le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique,

l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon et ;

5 (b) transférer un embryon au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T (+/- 25\% T)$;

10 (c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

En principe, la présente invention est applicable à tous les mammifères. Plus particulièrement, l'animal selon l'invention est un mammifère. L'invention est particulièrement intéressante pour les mammifères tels
15 les ongulés, les équidés, les camélidés, les rongeurs, les lagomorphes et les primates. Parmi les rongeurs, il convient de citer la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde. Parmi les ongulés, il convient de citer les bovins, les ovins, les caprins, les porcins. De
20 manière préférée le mammifère selon l'invention est un lagomorphe. L'invention est particulièrement intéressante pour les animaux qui jusqu'à présent étaient difficilement obtenus voire impossible à obtenir par clonage nucléaire, tel le lapin ou le rat.

25 Par « asynchronie », au sens de la présente invention, on entend désigner le temps ou retard exprimé en heure qui existe à un instant donné du développement embryonnaire entre le stade de développement d'un embryon normalement fécondé et qui
30 se développe selon les lois de la nature, et le stade de développement d'un embryon qui a un moment donné de son développement à au moins été manipulé *in vitro*, les

deux embryons étant de même âge et de même espèce. Par embryons de même âge, on entend définir que les embryons ont été conçus simultanément ou en même temps. Ainsi dans le cas d'un embryon normalement fécondé et
5 d'un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire, l'ovocyte énucléé aura le même âge que l'ovocyte normalement fécondé par un spermatozoïde. Les deux embryons peuvent appartenir à la même espèce animale mais aussi à des espèces différentes. Dans le
10 cas du clonage nucléaire chez le lapin, les deux embryons sont des embryons de lapin. Ces deux embryons peuvent être ou non de races différentes comme la race « New-Zealand », « Fauve-de-Bourgogne », « Argenté-de-Champagne », Californiennes, « Géant-de-Bouscat », ou
15 toutes races dont les spécificités zoologiques sont définies dans un standard officiel (Le lapin de race, Ed. 2000 Fédération Française de Cuniculture (Ed.) ou issus de croisements ayant donné lieu à des souches commercialisées de lapins telle la souche GD22/1077.

20 Par « cultivé *in vitro* », on entend désigner au sens de la présente invention, un embryon qui n'est pas naturellement conçu et/ou développé, c'est-à-dire un embryon pour lequel au moins une étape de sa conception et/ou de son développement est réalisée *in vitro*. Par
25 exemple, l'embryon « cultivé *in vitro* » au sens de la présente invention est cultivé et se développe dans une milieu de culture approprié contenant les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et/ou à la différenciation de l'embryon.

30 Par « manipulé *in vitro* », on entend désigner au sens de la présente invention, un embryon cultivé *in vitro* obtenu par transfert nucléaire et/ou modifié

génétiqnement par trangenèse. L'embryon est cultivé et/ou manipulé *in vitro* au plus tard jusqu'au jour qui précède l'implantation.

Selon la présente invention, l'évaluation et/ou la
5 détermination de l'asynchronie est réalisée au plus tard le jour de l'implantation utérine de l'embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénique ou par clonage; néanmoins, cette détermination de l'asynchronie est de préférence
10 réalisée à un stade de développement choisi parmi le stade 1 cellule, le stade 2 cellules, le stade 4 cellules, le stade 8 cellules, le stade 16 cellules, le stade morula et le stade blastocyste. De manière préférée, l'évaluation et/ou la détermination de
15 l'asynchronie est réalisée à partir d'embryon(s) ayant atteint le stade blastocyste *in vitro* et dont la cinétique de développement est comparée à celle d'embryons obtenus *in vivo*.

Cette évaluation et/ou la détermination de
20 l'asynchronie de développement T est réalisée de préférence par comptage cellulaire ou détermination de la proportion de cellules de l'embryon organisées en masse cellulaire interne, cellules qui contribueront à la formation du fœtus et d'une partie du placenta.
25 Néanmoins, d'autres technologies connues de l'homme de l'art peuvent être mises en œuvre pour effectuer cette évaluation et/ou détermination, telles par exemple la mise en évidence de l'expression et/ou de l'absence d'expression de marqueurs cellulaires caractéristiques
30 d'un stade de développement embryonnaire particulier.

L'asynchronie de développement T est de préférence supérieure ou égale à 15 heures, de manière préférée

supérieure ou égale à 16 heures, supérieure ou égale à 17 heures, supérieure ou égale à 18 heures, supérieure ou égale à 19h00, supérieure ou égale à 20h00, supérieure ou égale à 21h00, supérieure ou égale à 22h00, supérieure ou égale à 23h00, supérieure ou égale à 24h00, supérieure ou égale à 25h00, supérieure ou égale à 26h00, supérieure ou égale à 27h00, supérieure ou égale à 28h00, supérieure ou égale à 29h00, ou supérieure ou égale à 30h00. De manière plus préférée, la dite asynchronie de développement T est d'environ 24 heures.

Dans la méthode selon la présente invention, le dit embryon transféré à l'étape b) est cultivé dans les mêmes conditions que le dit premier embryon. Selon un premier mode de réalisation préférée, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule. Selon un second mode de réalisation, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 2 cellules. Selon un troisième mode de réalisation, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 4 cellules. Alternativement, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 8 cellules, au stade 16 cellules, au stade 32 cellules, au stade 64 cellules, ou à un stade plus avancé du développement.

Les méthodes d'obtention d'animaux mâles vasectomisés sont bien connues de l'homme de l'art, ainsi que les traitements hormonaux destinés à augmenter l'ovulation (voir par exemple : Kennely et Foote, 1965).

Le dit embryon transféré à l'étape b) du procédé selon l'invention se développe en fœtus, de manière préférée le dit fœtus se développe en nouveau-né, et le dit nouveau-né se développe en adulte. C'est donc

également un des objets de la présente invention de
fournir un embryon, un fœtus, un nouveau-né, un
mammifère adulte, excepté l'homme, ou des cellules
dérivées de ceux-ci, produit par une méthode comprenant
5 ou incluant la méthode selon l'invention. L'invention
concerne également la descendance du dit mammifère
adulte selon l'invention. Pour des raisons éthiques, il
est évident que les procédés selon l'invention ne
doivent pas être mis en œuvre à des fins de clonage
10 reproductif d'êtres humains.

En fonction des besoins, il peut être intéressant
d'arrêter le développement ou la gestation de l'embryon
au stade embryonnaire ou fœtal pour dériver les
cellules notamment les cellules de la masse cellulaire
15 interne, telles les cellules souches à partir du dit
embryon. Par cellules souches de l'embryon, on entend
désigner les cellules indifférenciées pluripotentes,
cultivables *in vitro* de façon prolongée sans perdre
leurs caractéristiques, et qui sont susceptibles de se
20 différencier en un ou plusieurs types cellulaires
lorsqu'elles sont placées dans des conditions de
culture définies. Ainsi, lorsque les cellules souches
selon l'invention sont des cellules ES, on peut
envisager d'induire la différenciation de celles-ci en
25 différents types cellulaires tel par exemple les
cellules musculaires, cardiaques, gliales, nerveuses,
épithéliales, hépatiques, pulmonaires, pancréatiques.
Ainsi, dans le cadre d'un clonage dit "thérapeutique",
l'embryon peut être un embryon humain obtenu par un
30 procédé de clonage nucléaire, intra- ou inter- espèces,
afin d'obtenir des cellules souches, différenciées ou
non, utiles pour le traitement préventif ou curatif de

patients nécessitant un tel traitement. Dans ce cas les étapes b) de transfert de l'embryon dans l'utérus et c) d'implantation de l'embryon transféré, du procédé selon l'invention, sont facultatives. L'homme du métier connaît les techniques de culture *in vitro* des cellules de la masse cellulaire interne (voir par exemple WO 97 37009) et des cellules souches embryonnaires en particulier, pour que celles-ci conservent leur totipotence ou leur pluripotence en culture (Evans et al., 1981; EP 380 646 ; WO 97 30151) ou pour que celles-ci induisent leur différenciation dans un type cellulaire particulier.

L'étape b) du procédé selon l'invention a pour objet le développement de l'animal non-humain depuis le stade embryonnaire jusqu'à son terme. Ceci peut être fait directement ou indirectement. Dans un développement direct, l'embryon réimplanté, transgénique ou non, reconstitué ou non, est simplement laissé se développer dans l'utérus de la femelle porteuse sans qu'aucune intervention étrangère ne survienne jusqu'au terme. Dans un développement indirect, l'embryon peut être manipulé avant que le développement complet ne se réalise. Par exemple, l'embryon peut être divisé, et les cellules développées de manières clonales, dans le but d'augmenter le rendement de production d'animaux clonés. Alternativement ou additionnellement, il est possible d'augmenter le rendement de production d'embryons viables par la mise en œuvre successive du procédé de transfert nucléaire selon l'invention.

L'embryon, fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, excepté l'homme, ou des cellules dérivés de ceux-ci,

obtenus par la mise en œuvre du procédé selon l'invention peuvent aussi être transgéniques. La transgénèse est soit réalisée lors de la culture *in vitro* de l'embryon, soit que l'embryon dérive d'un animal lui-même transgénique. Au sens de la présente invention, on entend désigner par « transgénique » une cellule ou un animal comportant au moins un transgène. On entend désigner par « transgène », du matériel génétique qui a été ou qui va être inséré artificiellement dans le génome d'une cellule d'un animal selon l'invention, particulièrement dans une cellule de mammifère cultivée *in vitro* ou dans une cellule de mammifère vivant et qui va s'y maintenir dans la dite cellule sous forme épisomale. Les méthodes pour générer des cellules transgéniques selon l'invention sont bien connues de l'homme de l'art. Elles incluent de manière non exhaustive, la technologie d'inactivation ciblée d'un ou plusieurs gènes par recombinaison homologue (« Knock-Out »), la technologie d'insertion ciblée d'un ou plusieurs gènes par recombinaison homologue (« Knock-In »), la technologie d'intégration aléatoire d'un transgène par la micro-injection dans le noyau. Le transgène selon l'invention, facultativement compris dans un vecteur linéarisé ou non, ou sous la forme d'un fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau (US 4 873 191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG,

polybrène, DEAE-Dextran...), l'infection virale, le sperme.

La réimplantation de l'embryon dans l'utérus d'une femelle porteuse utilise des techniques connues par l'homme du métier. Habituellement, la mère porteuse est anesthésiée et les embryons sont insérés dans l'oviducte. Le nombre d'embryons implantés dans un hôte particulier varie en fonction des espèces mais est habituellement compatible avec le nombre de nouveau-nés habituellement produits par ladite espèce. Les descendants transgéniques ou non de la mère porteuse sont criblés pour la présence et/ou l'expression du transgène ou d'un marqueur caractéristique des dits descendants en utilisant les méthodes adaptées. Le criblage est souvent réalisé par Southern-blotting ou par analyse en northern-blot en utilisant une sonde qui est complémentaire à au moins une portion du transgène ou du marqueur. Une analyse en Western-blot utilisant un anticorps contre la protéine codée par le transgène ou le dit marqueur peut être employée comme alternative ou comme méthode additionnelle pour cribler la présence du produit protéique codé par le transgène ou le dit marqueur. Typiquement, l'ADN est préparé à partir de cellules de l'animal, et notamment de lymphocytes chez le lapin, puis analysé par southern-blotting ou par PCR pour la présence du transgène. Alternativement, le tissu des cellules susceptibles d'exprimer le transgène ou le marqueur avec le taux le plus élevé sont testés pour la présence et/ou l'expression du transgène ou du marqueur en utilisant l'analyse par Southern-blot ou par PCR. Alternativement, des méthodes additionnelles pour évaluer la présence du transgène ou le marqueur

sont les méthodes biochimiques, telles que les tests enzymatiques et/ou immunologiques, les méthodes histologiques pour permettre de détecter la présence d'un marqueur particulier ou de certaines activités enzymatiques, les analyses par cytométrie de flux.

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un procédé *in vitro* de clonage de mammifère par transfert nucléaire comprenant ou incluant un procédé selon l'invention de production d'embryons de mammifères non humains qui comprend au moins l'étape d'évaluation et/ou de détermination de l'asynchronie de développement T entre deux embryons de même espèce et de même âge. Par transfert nucléaire ou transfert de noyau, on entend désigner le transfert de noyau d'une cellule donneuse provenant d'un animal selon l'invention, de préférence d'un mammifère, à un stade de développement compris entre le stade embryonnaire à adulte, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. En général, la cellule receveuse est un ovocyte. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans l'utérus de femelles porteuses pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture.

Le matériel génétique donneur est introduit par différents moyens dans la cellule receveuse énucléée pour former l'embryon reconstitué. Généralement le matériel génétique donneur est introduit par fusion en utilisant les méthodes telles que (i) l'exposition des cellules à des agents chimiques favorisant la fusion

comme l'éthanol, le polyéthylène glycol (PEG) ou d'autres glycols ; (ii) l'utilisation d'agent biochimiques, comme la phytohaemagglutinine (PHA) ; (iii) l'utilisation de virus inactivés, tel le virus Sendaï ; (iv) l'utilisation de liposomes ; (v) l'utilisation de l'électro-fusion. La présente invention ne se limite pas à l'utilisation de ces techniques de fusion et bien que la fusion cellule-cellule soit la méthode préférée pour réaliser le transfert nucléaire McGrath and Solter, 1984; WO 99 37143), d'autres méthodes également préférée peuvent être mise en œuvre, telle que la micro-injection, de préférence la micro-injection du noyau donneur (Wakayama et al., 1998).

Selon la présente invention, la cellule donneuse et la cellule receveuse, de préférence un ovocyte, proviennent du même animal, ou de deux animaux de la même espèce. Selon un autre mode de réalisation, la cellule donneuse et la cellule receveuse proviennent de deux animaux d'espèces différentes.

La combinaison du génome de la cellule donneuse activée et de l'ovocyte activée produit l'embryon obtenu par transfert nucléaire, ou embryon NT (pour « nuclear transfer »), encore appelé embryon reconstitué, termes qui seront utilisés indifféremment dans le présent brevet.

La cellule donneuse selon l'invention peut être n'importe quel type cellulaire qui contient un génome ou du matériel génétique, tel que les cellules somatiques, les cellules germinales, les cellules embryonnaires telles les cellules souches pluripotentes, les cellules souches totipotentes, comme

les cellules souches embryonnaires par exemple (cellules ES). Le terme « cellule somatique » se réfère à des cellules diploïdes différenciées. La cellule somatique peut indifféremment provenir d'un animal, ou
5 d'une culture de cellules ou de tissus ayant subi au moins un passage en culture et ayant été congelée ou non. Lorsque la cellule somatique dérive d'un animal, l'animal peut être à n'importe quel stade de développement, par exemple un embryon, un fœtus ou un
10 adulte. Les cellules somatiques comprennent de préférence et de manière non limitative les fibroblastes (par exemple, les fibroblastes primaires), les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les cellules cumulus, les cellules neurales, les
15 cellules mammaires, les hépatocytes, les cellules de Langerhans. De préférence, les cellules somatiques donneuses sont des cellules cumulus. Les cellules somatiques peuvent être obtenues par exemple par dissociation de tissus par des moyens mécaniques ou
20 enzymatiques (en général par l'utilisation de trypsine ou de protéases) pour obtenir une suspension cellulaire qui est en général cultivée jusqu'à l'obtention d'une monocouche cellulaire confluente. Les cellules somatiques peuvent être récoltées ou préparées pour la
25 cryopréservation et maintenues congelées jusqu'à une utilisation ultérieure. Les cellules donneuses de noyaux sont indifféremment à l'état prolifératif ou à l'état de quiescence. L'état de quiescence qui correspond au stade Go/G1 du cycle cellulaire est
30 obtenu chez les cellules en culture par inhibition de contact ou par privation en sérum (Whitfield et al., 1985). L'état prolifératif peut être considéré comme

correspondant à tous les autres stades du cycle cellulaire.

Les cellules receveuses selon la présente invention sont de préférence des ovocytes, de manière plus préférée des ovocytes activés. Les ovocytes 5 activés sont ceux qui sont à une étape de la division cellulaire méiotique qui comprend la prophase, l'anaphase, la métaphase, la télophase I et II, de préférence la métaphase I, l'anaphase I, l'anaphase II, 10 et de manière préférée la télophase II. L'invention concerne également les ovocytes en métaphase II qui sont considérés comme étant dans un état de repos, mais qui peuvent être activés par des techniques connus de l'homme de l'art (WO 00 25578). L'état de développement 15 de l'ovocyte est défini par une inspection visuelle de l'ovocyte sous un grossissement suffisant. Les ovocytes qui sont en télophase II sont par exemple identifiés par la présence d'une protusion de la membrane plasmique correspondant au second globule polaire. Les 20 méthodes pour identifier les différents stades de la division cellulaire méiotique sont connues de l'homme de l'art.

Différentes techniques ont été décrites pour activer les ovocytes, telles que l'utilisation 25 d'ionophores de calcium (par exemple la ionomycine) (voir brevet US 5 496 720) qui sont des agents qui augmentent la perméabilité de la membrane des ovocytes et permettent au calcium d'entrer dans les ovocytes. Egalement l'éthanol qui a les mêmes effets peut être 30 utilisé. Egalement l'activation des ovocytes peut être réalisée par des trains de stimulations électriques qui peuvent être utilisés chez le lapin pour contrôler le

taux de calcium dans l'ovocyte (Ozil et Huneau, 2001). De préférence, l'état d'activation de l'ovocyte est obtenu par un train d'impulsions électriques puis prolongé chimiquement en cultivant les ovocytes en présence d'inhibiteur de protéine kinase tel le 6-diméthyl-amino-purine (6-DMAP) et/ou en présence d'inhibiteur de la synthèse peptidique tel la cycloheximide (CHX). L'étape d'activation de l'ovocyte peut être réalisée avant, pendant et/ou après l'étape de fusion du noyau ou de la cellule donneuse avec l'ovocyte receveur.

Les ovocytes peuvent être obtenus par maturation *in vitro* de matériel obtenu par ponction folliculaire d'ovaires recueillis en abattoirs ou par aspiration des ovocytes à partir des follicules des ovaires à des temps déterminés du cycle reproductif d'une femelle ayant été ou non stimulée hormonalement de manière exogène (femelle super-ovulées). Les ovocytes sont maturés *in vivo* ou *in vitro* jusqu'au stade métaphase II ou télophase. Tous les ovocytes maturés *in vivo* doivent être récoltés par lavage de l'oviducte dans un tampon PBS (Phosphate buffered saline). Les ovocytes maturés *in vitro* sont collectés et transférés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum, tel que le sérum de veau fœtal (FCS, « fetal calf serum »). Les ovocytes sont dénudés des cellules cumulus puis énucléés tels que précédemment décrits par Adenot et al. (1997).

La présente invention porte plus particulièrement sur un procédé de production d'embryons de lapin comprenant les étapes suivantes :

- a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de lapin du même âge :
- 5 - le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé
 - 10 *in vitro* ;
 - le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter
 - 15 l'ovulation, le second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ;
 - l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine
 - 20 du dit second embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ; et
 - b) transférer un embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro*, pas plus âgé que le stade blastocyste dans l'utérus d'une femelle receveuse
 - 25 ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T$ (+/-25% T) ;
 - c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.
 - 30 L'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement compris entre les jours J1 et

J10 *post coïtum*, de préférence entre les jours J1 et J8 *post coïtum*. De manière plus préférée, l'évaluation et/ou la détermination est réalisée *in vitro* au jours J3 et J4 *post coïtum*.

5 Dans le procédé de production d'embryons de lapin selon l'invention, la dite asynchronie de développement T est de 23 heures +/-25%. De manière préférée, ladite asynchronie est d'environ 20 heures, d'environ 21 heures, d'environ 22 heures, d'environ 23 heures ou
10 d'environ 24 heures.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le dit embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique. Selon un autre mode préféré de réalisation, le dit embryon
15 cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire. De manière plus préférée, le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

20 Dans le procédé de production d'embryons de lapin selon la présente invention, le dit embryon transféré à l'étape b) est de préférence au stade 1, 2 ou 4 cellules, bien que des stades de développement ultérieurs puissent être envisagés:

25 Les embryons de lapin et/ou fœtus, nouveaux-nés, lapins adultes, la descendance des lapins adultes, ou les cellules dérivées de ceux-ci, produits par un procédé comprenant ou incluant la méthode de production d'embryons de lapin selon l'invention sont également
30 l'objet de la présente invention.

L'invention concerne également une méthode *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprenant

ou incluant un méthode de production d'embryons de lapins, de préférence transgéniques, selon l'invention. Plus particulièrement cette méthode *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprend les étapes de :

- a) insertion d'une cellule donneuse de lapin ou d'un noyau de cellule donneuse de lapin dans un ovocyte énucléé de lapine dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;
- 10 b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a) ;
- c) transfert dudit embryon reconstitué dans une lapine porteuse, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus, et éventuellement en nouveau
- 15 né ;

et est caractérisée en ce que la méthode comprend ou inclut un méthode de production d'embryons de lapins selon l'invention. De préférence, le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par fusion de

20 la cellule donneuse et du cytoplasme receveur ; alternativement, le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par micro-injection du noyau donneur dans le cytoplasme receveur.

Pour réaliser avec succès le clonage nucléaire chez

25 des espèces animales jusqu'à présent réfractaires à une telle technologie comme par exemple le lapin et le rat, ou chez des espèces animales difficile à cloner, il est également important que la phase d'activation *in vitro* de l'embryon reconstitué soit la plus brève possible.

30 En effet, dans des espèces telles le lapin, cette phase S survient très rapidement par rapport à d'autres espèces (Szöllösi, 1966). Le raccourcissement de la

procédure d'activation permet que la phase de répllication de l'ADN (phase S) du premier cycle cellulaire puisse survenir, par rapport à l'ovulation, à un moment identique à celui du développement normal.

5 La présente invention fournit donc des moyens de réduire la phase d'activation *in vitro* de l'embryon reconstitué, afin de garantir une cinétique de développement suffisante pour que l'embryon ne se retrouve pas en dehors de la fenêtre d'implantation

10 même après désynchronisation. Les inventeurs ont ainsi démontré de manière tout à fait surprenante, que le mélange de deux drogues, l'une étant un inhibiteur de protéine kinase, tel la 6-diméthylaminopurine (6-DMAP), et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique,

15 tel le cycloheximide (CHX), jusqu'ici utilisées séparément pour réaliser l'activation des embryons reconstitués, permettait d'obtenir une activation plus efficace sur des temps plus court tout en limitant les effets secondaires connus de ces drogues notamment sur

20 l'initiation de la phase S et la répllication de l'ADN. Aussi, dans le procédé selon l'invention, la phase d'activation au cours de la culture *in vitro* est réalisée par adjonction de préférence simultanée, ou successive ou décalée dans le temps, au milieu de

25 culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique. De manière préférée, la dite activation est réalisée par adjonction simultanée de 6-DMAP et de cycloheximide

30 (CHX). Les concentrations en 6-DMAP et CHX pour réaliser une telle activation chez le lapin sont respectivement comprises entre 1 et 5 millimolaires

(mM), de préférence 2 mM et 1 à 10 microgrammes (μ g) de préférence 5 μ g par ml. La durée de l'activation s'étend de préférence de 30 minutes à 2 heures, de préférence une heure. L'homme du métier adaptera sans difficulté ces paramètres en fonction pour d'autres mammifères que le lapin.

La présente invention porte donc également sur un procédé d'activation d'embryon reconstitué ou non, transgénique ou non, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape d'ajouter au milieu de culture du dit embryon, successivement, simultanément, ou de manière décalée dans le temps, au moins un inhibiteur de protéine kinase, plus particulièrement impliquée dans la reprise de la méiose, et de préférence la 6-DMAP, et au moins un inhibiteur de la synthèse protéique, de préférence la cycloheximide (CHX).

La présente invention porte aussi sur un procédé *in vitro* de clonage de mammifère tel que précédemment décrit, comprenant les étapes: (i) d'insertion d'une cellule donneuse ou d'un noyau de cellule donneuse dans un oocyte énucléé de mammifère de la même espèce ou d'une espèce différente de celle de la cellule donneuse, dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ; (ii) d'activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape (i) ; et de (iii) transfert dudit embryon reconstitué dans une femelle porteuse de mammifère, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus, caractérisé en ce que la dite activation est réalisée par adjonction successive, simultanée, ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase, de préférence

la 6-DMAP, et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique, de préférence la cycloheximide (CHX). De préférence, la dite activation est réalisée par adjonction simultanée de 6-DMAP et de CHX pour une
5 durée d'activation qui s'étend de préférence de 30 minutes à 2 heures, de préférence une heure.

C'est également un des objets de la présente invention de fournir une méthode de production d'une protéine recombinante par un animal transgénique,
10 notamment de lapin, obtenu par un procédé selon l'invention. Le transgène qui code pour la dite protéine recombinante n'est pas limité à une séquence particulière d'ADN. La séquence d'ADN du transgène peut être d'une origine purement synthétique (par exemple
15 réalisée en routine à partir d'un synthétiseur d'ADN), ou peut dériver de séquences d'ARNm par reverse transcription, ou peut dériver directement de séquences d'ADN génomique. Lorsque la séquence d'ADN dérive de séquences d'ARN par reverse transcription, celle-ci
20 peut contenir ou non tout ou partie de séquences non codantes telles les introns, selon que la molécule d'ARN correspondante a ou non subi, partiellement ou totalement, un épissage. Le transgène peut être aussi petit que quelques centaines de paires de bases d'ADNc
25 ou aussi large qu'une centaine de milliers de paires de bases d'un locus génique comprenant la séquence codante exonique-intronique et les séquences de régulation nécessaires à l'obtention d'une expression contrôlée de manière spatio-temporelle. De préférence, le segment
30 d'ADN recombiné a une taille comprise entre 2,5 kb et 1 000 kb. Quoi qu'il en soit, les segments d'ADN recombinés peuvent être inférieurs à 2,5 kb et

supérieurs à 1 000 kb. Le transgène ou la séquence d'ADN de la présente invention est de préférence sous forme native, c'est-à-dire dérivée directement d'une séquence d'ADN exogène naturellement présente dans une
5 cellule animale. Cette séquence d'ADN sous forme native peut être modifiée par exemple par insertion de sites de restriction nécessaires au clonage et/ou par insertion de sites de recombinaison site-spécifiques (séquences lox et flp). Alternativement, la séquence
10 d'ADN de la présente invention peut avoir été créée artificiellement *in vitro* par les techniques de l'ADN recombinant, en associant par exemple des portions d'ADN génomique et d'ADNc.

Le transgène qui code pour la dite protéine
15 recombinante contient de préférence des séquences de régulation appropriées pour diriger et contrôler l'expression des gènes codant desdits polypeptides dans le ou les type(s) cellulaire(s) approprié(s). Par éléments contrôlant l'expression génique, on entend
20 désigner toutes les séquences d'ADN impliquées dans la régulation de l'expression génique c'est-à-dire essentiellement les séquences régulatrices de la transcription, de l'épissage, de la traduction. Parmi les séquences d'ADN régulatrices de la transcription,
25 il convient de citer la séquence promotrice minimale, les séquences amonts (par exemple, la boîte SP1, l'IRE pour «interferon responsive element»,...), les séquences activatrices (« enhancers »), éventuellement les séquences inhibitrices (« silencers »), les séquences
30 insulateurs (« insulators »), les séquences d'épissage. Les éléments contrôlant l'expression génique permettent soit une expression constitutive, ubiquitaire,

inductible, spécifique d'un type cellulaire (« tissu-spécifique ») ou spécifique d'une étape du développement. Ces éléments peuvent être ou non hétérologues à l'organisme, ou être naturellement
5 présents ou non dans le génome de l'organisme. Il est évident qu'en fonction du résultat recherché, l'homme du métier choisira et adaptera les éléments de régulation de l'expression des gènes. Pour diriger l'expression du transgène dans un fluide biologique de
10 l'animal, tel le lait, la séquence régulatrice de la transcription utilisée est sélectionnée dans les séquences promotrices des gènes actifs spécifiquement dans les cellules sécrétant ces fluides biologiques, telles les cellules des glandes mammaires par exemple
15 pour diriger l'expression dans le lait. Parmi les fluides biologiques préférés, il convient de citer le lait, le sang, le sperme, l'urine. De manière préférée, la protéine recombinante selon l'invention est sécrétée par les cellules des glandes mammaires dans le lait.
20 Ainsi, les séquences promotrices ou promoteurs préférés sont ceux qui sont à la fois efficace et spécifique dans le tissu mammaire. Par efficace, on entend que les promoteurs sont forts dans les tissus mammaires et peuvent supporter la synthèse de grande quantité de
25 protéine sécrétée dans le lait. Parmi, ces promoteurs il convient de citer les promoteurs de la caséine, de la lactoglobuline, de la lactalbumine, qui incluent de manière non limitative les promoteurs α -, β -, et γ -caséine, le promoteur de l' α -lactalbumine et les
30 promoteurs de la β -lactoglobuline. Les promoteurs préférés proviennent des rongeurs, souris ou rat, du lapin, du porc, de la chèvre, du mouton. De manière

plus préférée, le promoteur est celui d'un gène de la protéine acide du petit lait (WAP, pour whey acidic protein), et le promoteur WAP le plus préféré est un promoteur WAP de lapin décrit dans le brevet US 5 965 788, le promoteur WAP de porc, le promoteur WAP de souris.

L'utilisation d'un animal transgénique, notamment d'un lapin transgénique, obtenu par un procédé selon l'invention pour la production de protéines recombinantes d'intérêt, de préférence dans le lait de l'animal, est un objet de la présente invention. La protéine recombinante d'intérêt peut être n'importe quelle protéine, par exemple une protéine thérapeutique telle que la α -, β -, δ -globine, les facteurs de coagulation sanguine (facteurs VIII et IX), les récepteurs de surface cellulaire, les anticorps, les enzymes, etc... et autres protéines nécessaires pour par exemple corriger des défauts hérités ou acquis chez un patient.

L'invention concerne également l'utilisation d'un animal transgénique, de préférence d'un lapin transgénique, susceptible d'être obtenu par la méthode selon l'invention, comme modèle d'étude de pathologies humaines. A titre d'exemple de pathologies humaines, il convient de citer la mucoviscidose, l'athérosclérose, les cancers, les maladies du métabolisme, les pathologies oculaires. Compte tenu des polymorphismes génétiques présents dans la population, il peut être intéressant pour analyser ou obtenir une réponse physiologique, physiopathologique ou comportementale caractéristique que les animaux transgéniques selon l'invention, et notamment les lapins transgéniques

selon l'invention présentent des fonds génétiques différents. Ainsi, les lapins selon l'invention pourront être sélectionnés dans les races New-Zealand, Fauve-de-Bourgogne, Argenté-de-Champagne, Californiennes, Géant-de-Bouscat, toutes races dont les spécificités zoologiques sont définies dans un standard officiel (Le lapin de race, Ed. 2000 Fédération Française de Cuniculture (Ed.) et leurs croisements notamment ceux qui donnent lieu à des souches commercialisées telle la souche GD22/1077.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants.

FIGURES :

FIGURE 1 : Images confocales d'un embryon reconstitué (NT) au stade 1 cellule immunomarcué en utilisant un anticorps anti-alpha tubuline (vert) et de l'ADN avec de l'iodure de propidium (rouge).

(A). Avant le second tour d'électro-stimulation, la chromatine apparaît condensée dans les chromosomes et accrochée au fuseau ; les flèches dans l'encart (vue agrandie 3 fois de la région du fuseau) indique des chromosomes individuels proches des pôles du fuseau. **(B).** Suite au retrait du CHX et du 6-DMAP, 72% des embryons reconstitués (NT) (n=25) présentent déjà un petit noyau et un réseau micro-

tubulaire interphasique formé (flèche). (C). 1 heure après le retrait des drogues, tous les embryons reconstitués (NT) sont en interphase et 71% (n=17) d'entre eux présentent un unique et large noyau ressemblant au pronucléus comme observé dans les zygotes de lapin. Barre = 50 μ m.

FIGURE 2 : Développement de blastocystes reconstruits de lapin avec des cellules cumulus ou dérivés d'œufs activés *in vitro* ou fécondés *in vivo*.

(A), Augmentation *in vitro* du nombre de cellules entre les jours J3 et J4 d'embryons récupérés soit directement à partir de donneurs (*in vivo*, n=27), soit cultivés à partir du stade une cellule (environ 20 heures post HCG), soit après accouplement naturel (*in vitro*, n=44) soit par transfert nucléaire (n=31, NT); (B), Diamètre moyen et longueur moyenne des disques embryonnaires au jour J8 ; (C), exemple de blastocyste reconstruit (obtenu par transfert nucléaire) retardé et récupéré au jour J8 après un transfert au stade 4 cellules dans une femelle receveuse asynchrone (-16 heures) ; le disque embryonnaire (grande flèche) est visible mais le blastocyste est encore entouré par une fine couche de protection de l'embryon (petite flèche) qui devrait normalement avoir disparu au jour J7 (Denker, 1981). Des embryons fécondés *in vivo* sont récoltés soit directement à partir de donneurs (*in vivo*) ou suite à un transfert dans des femelles receveuses au stade 1

cellule (contrôle). Les embryons fécondés *in vitro* sont collectés au stade 1 cellule (*in vitro*).

FIGURE 3 : Représentation schématique du protocole utilisé pour le développement *in vivo* des embryons reconstitués à partir des cellules donneuses cumulus. Seuls les embryons transférés au stade 4 cellules dans des femelles asynchrones (à 22 heures) se développent à terme.

FIGURE 4 : Des lapins nés par transfert nucléaire. (A), lapin cloné N° 0107 avec les contrôles correspondants : **A1**, expression de la protéine auto-fluorescente eGFP (tête de flèche) détectée par microscopie confocale à partir de follicules de poils obtenus par une biopsie d'oreille à 1 mois ; **A2**, idem mais la détection est réalisée par microscopie à transmission lumineuse ; **A3**, amplification du transgène eGFP (PCR 2) et de l'exon 10 du gène CFTR utilisé comme contrôle de qualité de l'ADN (PCR 1) ; ceci confirme que le lapin N° 0107 (lignes 8 et 9) et sa descendance N° 107B (qui est décédé 1 jour après la naissance ; lignes 10 et 11) dérivent de cellules cumulus de donneurs (lignes 12 à 13) ; **B1-B2**, 3 autres lapins de 2 autres portées différentes ; les lapins dans **B1** ont maintenant prouvé qu'ils étaient fertiles.

EXEMPLES

1) MATERIELS ET METHODES

5 1.1) Source des ovocytes et des cellules cumulus

Des ovocytes en métaphase II (MII) sont collectés à partir de lapines « New-Zealand » superovulées par injections d'hormones FSH suivies d'une injection d'hormone HCG, accouplées à un mâle vasectomisé 16 heures après une injection de chorio-gonadotrophine Humaine (hCG). Les ovocytes sont ensuite incubés dans 0,5% de hyaluronidase pendant 15 min (Sigma) pour éliminer les cellules cumulus par un pipetage doux. Pour le transfert nucléaire, les ovocytes sont énucléés 15 tels que décrits précédemment (Adenot et al., 1997). Simultanément, des cellules cumulus sont prélevées soit sur des lapines de race « New-Zealand » ou des lapines F1 obtenues par croisement entre des lapins de race « New-Zealand » croisés avec des lapins de race 20 « Fauves de Bourgogne » ou des femelles lapines F1 transgéniques « New-Zealand » comportant une construction d'ADN avec une séquence codante pour la protéine de fluorescence verte augmentée (eGFP) placée sous le contrôle d'un promoteur EF1 (« elongation 25 factor 1 ») ou d'un promoteur HMG. La fluorescence eGFP et les réactions d'amplification PCR sont utilisées comme marqueurs des cellules donneuses cumulus. Les cellules cumulus sont ensuite conservées à 38°C dans du PBS sans calcium ni magnésium supplémenté avec 1% de 30 PVP 40 000 (polyvinyle pyrrolidone (PVP)) avant leur utilisation comme cellules donneuses de noyaux.

1.2) Activation des ovocytes et transfert nucléaire

Pour reconstruire par transfert nucléaire (NT) les
5 embryons, des cellules cumulus individuelles sont
insérées par micro-manipulation sous la zone pellucide
des ovocytes énucléés. Les embryons obtenus par
transfert nucléaire (embryons NT) et les ovocytes MII
sont activés de la manière suivante : 2 phases de
10 stimulations électriques sont appliquées à 1 heure de
décalage avec un stimulateur Grass (3 pulses de courant
continu de $3,2 \text{ kV} \times \text{cm}^{-1}$ pendant $20 \text{ } \mu\text{s}$ chacun dans du
mannitol $0,3 \text{ M}$ contenant $0,1 \text{ mM}$ de Ca^{2+} et de Mg^{2+}), la
première phase induisant la fusion de l'ovocyte et de
15 la cellule cumulus. Les embryons reconstitués sont
maintenus une heure dans un milieu de culture à 38°C .
Après la seconde phase, les embryons NT sont incubés en
présence de la cycloheximide ($5 \text{ } \mu\text{g/ml}$) et de 6-DMAP (2 mM)
dans du milieu M199 pendant 1 heure ; les ovocytes
20 sont incubés avec l'une de ces drogues ou les deux
simultanément pendant 1 heure. Après un lavage extensif
pour enlever les drogues, les cellules sont à nouveau
remises en culture dans une microgoutte de $50 \text{ } \mu\text{l}$ de
milieu B2 supplémenté avec $2,5\%$ de sérum de veau fœtal
25 (FCS) sous de l'huile minérale (Sigma M8410) à 38°C
sous une atmosphère saturée en $5\% \text{ CO}_2$. Ce protocole
d'activation est appliqué aux embryons NT, environ 18 à
20 heures après l'accouplement des donneurs.

30

1.3) Analyse des stades préimplantatoires

L'organisation microtubulaire et la chromatine dans les embryons NT au stade 1 cellule sont observés tel que précédemment décrit (Adenot et al., 1997), excepté que l'état de fixation dure 20 min à 37°C et que le milieu de montage est du Vectashield (Vector Laboratories). Les taux de clivage des embryons NT et des parthénotes sont évalués de 21 heures à 23 heures après l'électro stimulation. Les taux de développement jusqu'au stade blastocyste sont estimés après une culture *in vitro* de 3 à 4 jours. Pour l'évaluation du nombre de cellules, les embryons sont fixés tel que précédemment décrit, puis colorés avec du Hœchst 33442 à 1 µg/ml puis montés sur des lames à puits dans du Vectashield et analysés sous épifluorescence. Les contrôles sont des blastocystes qui se sont soit développés *in vitro* à partir d'un embryon 1 cellule collecté à partir d'une lapine superovulée ou qui se sont développés *in vivo* à partir de femelles non superovulées croisées avec un mâle puis sacrifiées 3 ou 4 jours plus tard.

1.4) Développement *in vivo* :

Les femelles receveuses sont croisées avec un mâle vasectomisé soit au même moment ou 16 heures ou 22 heures après le croisement des femelles donneuses d'ovocytes avec un mâle vasectomisé. Dans le cas de femelles synchrones (c'est-à-dire croisées au même moment que les femelles donneuses d'ovocytes) les embryons reconstitués NT sont transplantés au stade 1 cellule 1 à 3 heures après l'activation ou sont transplantés au stade 4 cellules après une culture pendant la nuit. Dans le cas de femelles receveuses

asynchrones (c'est-à-dire croisées 16 heures ou 22 heures après les femelles donneuses d'ovocytes), les embryons reconstitués NT sont transplantés soit au stade 1 cellule ou soit au stade 4 cellules après une culture sur la nuit. Les embryons sont transplantés chirurgicalement à travers l'infundibulum dans chacun des oviductes des femelles receveuses. Le taux d'implantation de parthénotes et d'embryons NT est évalué après sacrifice des femelles receveuses au jour J8. La grossesse est déterminée par palpation 13 ou 14 jours après la transplantation des embryons et les femelles receveuses enceintes sont accouchées par césarienne 31 jours après l'accouplement.

1.5) Analyse PCR

La présence de marqueurs transgéniques GFP est détectée par PCR en utilisant un primer-sens (SEQ ID N° 1) et une amorce antisens (SEQ ID N° 2) (GENSET, France). Pour contrôler la qualité de l'ADN, la PCR est réalisée sur 300 à 400 ng d'ADN préparés avec le kit d'extraction de tissus (QIAGEN, USA) avec l'amorce-sens (SEQ ID N° 3) et l'amorce antisens (SEQ ID N° 4) qui couvre l'exon 10 du gène CFTR du lapin (GENSET, France). Les amplifications sont réalisées avec de la Taq Polymérase (Q.BIOGEN, France) à travers 35 cycles d'amplification, de la façon suivante : 94°C pendant 20 s, 57°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. La taille des fragments amplifiés est de 240 paires de bases pour le gène CFTR et de 350 paires de bases pour le transgène eGFP. Les fragments de PCR sont séparés sur un gel d'agarose à 1,5% dans du TAE (Tris Acétate EDTA) puis colorés avec du bromure d'éthidium et sont

comparés à une échelle de 100 paires de bases utilisée comme marqueur de taille (BIOLABS, Angleterre). Les contrôles négatifs sont constitués par de l'eau bidistillée et de l'ADN de la femelle receveuse, alors
5 que le contrôle positif correspond à de l'ADN de fibroblaste transgénique cultivé.

2) ACTIVATION, ASPECT NUCLEAIRE ET DEVELOPPEMENT IN VITRO DES EMBRYONS DE LAPIN RECONSTITUES OBTENUS PAR TRANSFERT NUCLEAIRE

Les inventeurs ont précédemment décrit (Adenot et al., 1997) que les ovocytes ovulés de lapines vieillies dans les oviductes avant leur collecte (vieillissement *in vivo*), forment des pronucléi durant une période
15 d'une heure après l'activation par un stimuli: ceci correspond à un temps 3 fois plus rapide que lorsque les ovocytes fraîchement ovulés sont cultivés jusqu'au même âge (vieillissement *in vitro*).

Lorsque des ovocytes sont activés en présence de
20 l'inhibiteur de la phosphorylation protéique (6-DMAP), ces ovocytes forment des pronucléi plus rapidement que le feraient des ovocytes âgés *in vivo* (données non publiées des inventeurs). Ainsi, les conditions d'activation peuvent altérer de manière importante le
25 timing de la formation nucléaire des zygotes de lapin. A l'inverse, d'autres espèces de mammifères, le zygotes de lapin a la particularité d'entrer dans la phase S très tôt après l'activation (Szöllösi, 1966). Ceci indique que la durée de la métaphase II (MII) jusqu'à
30 la transition interphasique doit être examinée avec attention lorsque l'on établit un protocole d'activation pour le transfert nucléaire dans cette

espèce. Dans le clonage somatique de mammifère, le 6-DMAP ou l'inhibiteur de synthèse protéique cycloheximide (CHX) sont souvent utilisés suite à l'activation d'embryons obtenus par transfert nucléaire (NT) par des agents augmentant la concentration en calcium intracellulaire. Ces drogues favorisent l'inactivation de cdc2/cyclin-B et des kinases ERK/MAP impliquées dans l'arrêt des ovocytes au stade MII. La cycloheximide néanmoins inhibe également la réplication de l'ADN dans les ovocytes activés (Moos et al., 1996 ; Soloy et al., 1997) et la 6-DMAP peut également affecter l'activité kinase connue pour être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Meyer et al., 1997). Les inventeurs ont donc considérés qu'une incubation d'1 heure avec du CHX et/ou du 6-DMAP après une activation des ovocytes pourrait être suffisante pour l'espèce lapin. Les expériences précédentes, infructueuses, de clonage somatique du lapin utilisaient une incubation en 6-DMAP de 2 (Yin et al., 2000 ; Dinnyés et al., 2001) ou de 4 (Mitalipov et al., 1999) heures. Dans la présente invention, les inventeurs ont trouvé que des ovocytes MII activés électriquement, exposés 1 heure à de la CHX (n = 48), 6-DMAP (n = 48) ou à un mélange des 2 drogues (n = 130) se clivent de manière efficace au stade 2 cellules (94%, 96% et 100% respectivement). Néanmoins, il se développe au stade blastocyste de manière significativement meilleure lorsqu'ils sont exposés simultanément au CHX et au 6-DMAP (89%) ou au 6-DMAP seul (79%) que au CHX seul (50%) (tableau 1). Ces taux sont supérieurs (Dinnyés et al., 2001 ; Mitalipov et al., 1999) ou similaires (Yin et al., 2000) à ceux

rapportés par d'autres chercheurs qui utilisent pour
traiter les ovocytes la 6-DMAP pendant 2 heures après
l'électro stimulation (Yin et al., 2000 ; Dinnyés et
al., 2001) ou pendant 4 heures après
5 l'électrostimulation (Mitalipov et al., 1999 ; Dinnyés
et al., 2001) ou qui utilisent l'ionomycine (Mitalipov
et al., 1999).

Les inventeurs ont utilisé un protocole
d'activation utilisant un mélange CHX/6-DMAP pour
10 reconstruire des embryons NT avec un noyau fraîchement
collecté de cellules-cumulus. Les inventeurs ont choisi
ce type de cellules, considéré comme arrêté au stade
G1/G0 de leur cycle cellulaire, parce que ces cellules
ont été initialement utilisées comme un modèle pour
15 démontrer la faisabilité du clonage somatique (Wakayama
et al., 1998 ; Wells et al., 1999). Les observations au
microscope confocal d'embryons NT fixés juste avant la
seconde phase d'électro-stimulation montrent que la
chromatine est condensée en chromosomes et associée au
20 fuseau (N = 14 ; fig. 1A). Cette condensation résulte
de la haute activité MPF dans le cytoplaste receveur
(Campbell et al., 1996). Quoiqu'il en soit, un
agencement typique des chromosomes caractéristiques des
ovocytes MII n'a pas été observé. Au lieu de cela, des
25 chromosomes collapsés forment un plateau métaphasique
mal aligné et des chromosomes individuels sont parfois
observés proches des pôles du fuseau (fig. 1A, insert).
Cette structure chromatinienne inhabituelle,
probablement liée au stade nucléaire du noyau donneur
30 (Wakayama et al., 1998) est compatible avec un
développement jusqu'à son terme chez la souris
(Wakayama et al., 1998 ; Wakayama et al., 1999). Après

avoir éliminé les drogues, les inventeurs ont observé que 72% des embryons de lapin NT (N = 25) exhibaient déjà une chromatine interphasique et une organisation microtubulaire (fig. 1B). 1 heure après, tous les
5 embryons étaient en interphase et 71% d'entre eux (N = 17) montraient une structure pronucléaire large et unique (fig. 1C) comme celle observée chez les zygotes de lapin (données non montrées). De ces observations, les inventeurs ont conclu que la transition métaphase
10 II vers interphase est rapide dans les embryons NT reconstitués et conduisent à un remodelage apparemment normal de la chromatine étrangère par le cytoplasme de l'ovocyte.

Lorsque les embryons NT sont laissés en culture
15 (n = 135), 93% d'entre eux se clivent au stade deux cellules et 47% d'entre eux se développent en blastocystes. Les taux de développement pré-implantatoires préalablement obtenus dans des expériences de clonage somatique chez le lapin étaient
20 bien plus bas (16 à 30%) que ce soit avec des cellules-cumulus (Yin et al., 2000) ou des fibroblastes donneurs (Dinnyés et al., 2001 ; Mitalipov et al., 1999).

Les embryons NT atteignent le stade blastocyste *in vitro* au jour J3 (J3) comme le font les zygotes et les
25 parthénotes, mais leur croissance déterminée par le nombre compté de cellules, est plus lente, ce qui a pour conséquence que ces embryons NT ont un développement au jour J4 d'environ 1 jour en arrière (fig. 2A).

30

3) DEVELOPPEMENT IN VIVO D'EMBRYONS DE LAPIN OBTENUS PAR TRANSFERT NUCLEAIRE

Dans les espèces de lapins, le développement *in vivo* des blastocystes est rapide et important. Ce développement se propage sur les parois avoisinantes de l'utérus, de telle sorte que la position individuelle des blastocystes devient rapidement reconnaissable en tant que sites d'implantation dès le stade J6 dans les cornes utérines de femelles receveuses sacrifiées (Denker, 1981). Les inventeurs ont trouvé que des embryons obtenus par transfert nucléaire pouvaient former des sites d'implantation à un transfert au stage 1 ou 4 cellule(s) dans l'utérus de femelles receveuses synchrones (c'est-à-dire croisées avec un mâle vasectomisé au même moment que les femelles donneuses de noyaux). Néanmoins, le nombre de sites d'implantation des blastocystes obtenus par transfert nucléaires (NT) est moins important qu'avec ceux des contrôles et des parthénotes (tableau 2) ; aucune structure embryonnaire obtenue par NT ne peut être mise en évidence suite à la dissection des cornes utérines au jour J8.

Lorsque des embryons NT au stade 4 cellules sont transférés dans des femelles receveuses asynchrones croisées 16 heures après les femelles donneuses (fig. 3), le taux d'implantation augmente (tableau 2) et n'est pas significativement différent de celui obtenu avec les contrôles (transfert synchrone) ou avec les parthénotes (transfert synchrone ou asynchrone). Dans ces conditions, les inventeurs ont pu collecter des embryons au stade blastocyste avancé ; ces embryons présentent un disque embryonnaire plat (fig. 2C grande flèche) d'environ 1,1 mm de longueur (n = 8, gamme 0,8 - 1,5 mm) et tous sauf un sont encore

clairement entourés d'une fine couche de protection de matériel extra-cellulaire (petite flèche, fig. 2C) qui a été progressivement apposée à la surface des embryons de lapin tout au long du transit dans le tractus

5 génital femelle. La dissolution de ces muco-substances dépend des actions synergiques des blastocystes et de l'endomètre (Denker et al., 1975) et contribue à générer une fenêtre très étroite d'implantation dans cette espèce. Lorsque ces embryons sont examinés avec

10 attention à partir du pôle abembryonique, aucune désorganisation apparente de la couverture ne peut être observée indiquant que les blastocystes obtenus par transfert nucléaire étaient équivalents pour le moins aux embryons normaux au stade J7 (Denker, 1981). Aucune

15 des femelles receveuses transplantées, soit de manière synchrone ou asynchrone (16 heures) ne peut être diagnostiquée enceinte à la mi-gestation (tableau 3), même lorsqu'on leur a transféré des embryons « helpers » non manipulés d'une autre race de lapin

20 (fauves de Bourgogne ; données non montrées) ou lorsqu'on leur a transféré un excès d'embryons obtenus par transfert nucléaire (jusqu'à 39 par femelle, données non montrées). Ces observations suggèrent que seulement très peu des blastocystes obtenus par

25 transfert nucléaire peuvent s'implanter parce que leur développement n'est pas retardé. Ceci a été confirmé par le fait que, lorsqu'on effectue un examen au jour J8, les inventeurs peuvent observer dans un cas un blastocyste obtenu par transfert nucléaire déjà

30 adhérent à l'épithélium utérin (données non montrées), ce blastocyste étant très similaire en taille au contrôle normalement implanté (gamme 1,1 à 2,6 mm, fig.

2B). Bien qu'ils soient plus petits que les embryons normaux *in vivo* au stade J8 (Gottschewski et al., 1973) (fig. 2B), ces contrôles peuvent normalement se développer jusqu'à terme suite à un transfert au stade
5 1 ou 4 cellule(s) dans des femelles receveuses synchrones (données non montrées).

Les inventeurs ont ainsi étendu l'asynchronie entre des femelles donneuses et des femelles receveuses de 16 à 22 heures (fig. 3). Une telle asynchronie marquée à
10 des stades de clivage précoce du développement n'a jamais été réalisée par le passé avec des embryons obtenus par transfert nucléaire et est compatible avec un développement à terme de zygotes. Dans ces conditions, 10/27 (37%) des femelles receveuses
15 asynchrones (22 heures) ont été diagnostiquées enceintes après palpation au jour J14. A partir de ces femelles, 4 (40%) ont donné naissance au jour J31 à 6 lapereaux vivants (fig. 4) pesant de 30 à 90 g (poids moyen : 65 g). Une telle variabilité est également
20 observée lorsque les lapereaux sont nés d'une portée d'une taille réduite (de 1 à 4 fœtus) ce qui survient de manière occasionnelle dans l'animalerie notamment quand les lapins sont issus d'embryons micro-injectés avec des solutions d'ADN au stade pro-noyau.
25 L'expression du marqueur transgénique eGFP à partir des follicules pileux dès la naissance (fig. 4) et à partir de lymphocytes obtenus à l'âge de 1 mois environ (données non montrées) confirme que les lapereaux résultent bien de transfert nucléaire de cellules-
30 cumulus. Des lapereaux ayant une apparence morphologique normale (poids respectifs : 90 et 30 g) sont décédés 1 jour après la naissance et, pour l'un

d'entre eux, les inventeurs suspectent une déficience dans le processus d'adoption par la mère allaitante. Les 4 autres lapereaux se sont développés normalement et deux d'entre eux (fig. 4, en bas à gauche) se sont
5 reproduits et ont donné naissance à respectivement 7 et 8 jeunes lapereaux sains suite à un croisement naturel.

La présente invention permet de surmonter les limitations rencontrées lors du clonage de certaines
10 espèces de mammifère considérée comme difficiles à cloner jusqu'à présent, telles le lapin (Solter 2000). Ces limitations peuvent être surmontées en prenant en compte les différences apparemment ténues entre les développements de l'ovocyte et embryonnaire précoce.
15 Les résultats présentés par les inventeurs indiquent donc que le clonage somatique peut être réalisé avec succès dans n'importe quelle espèce de mammifère. De manière surprenante, un timing écourté, des procédures d'activation classiques et une asynchronie de presque 1
20 jour lors du transfert des embryons reconstruits dans des femelles receveuses retardées compensent le retard du développement qui existe déjà au moment du premier clivage et semblent avoir un effet décisif sur l'obtention d'embryons de lapins obtenus par transfert
25 nucléaire.

Le procédé d'obtention de lapin par clonage nucléaire est d'un grand intérêt industriel notamment pour l'obtention de lapins transgéniques exprimant une
30 protéine d'intérêt, ou pour la genèse de modèle animaux de pathologies humaines.

Tableau 1. Effet de différents traitements sur le
développement in vitro après activation parthénogénique
d'ovocytes de lapine

<u>Traitement</u>		Nombre d'ovocytes utilisés	Nombre d'ovocytes clivés (%)	Nombre de blastocystes (%)
Activation électrique 1 heure d'incubation dans du M 199 +				
CHX	30 min	48	41 (85.4)	19 (39.6)
CHX	1 h	48	45 (93.7)	24 (50.0)
CHX	4 h	48	47 (97.9)	25 (52.1)
6-DMAP	30 min	48	43 (89.6)	32 (66.7)
6-DMAP	1 h	48	46 (95.8)	38 (72.9)
6-DMAP	1 h	48	47 (97.9)	35 (72.9)
CHX/6DMAP	30 min	52	45 (93.7)	37 (71.1)
CHX/6DMAP	1 h	130	130 (100.0)	116 (89.6)
CHX/6DMAP (ovocytes reconstitués)	1 h	36	36 (100.0)	32 (88.9)

10 (CHX : cycloheximide ; 6-DMAP : 6-diméthylaminopurine)

**Tableau 2. Implantation après transfert dans des femelles
receveuses synchrones et asynchrones (-16 heures)**

Type d'embryons	Type de femelles receveuses	Femelles receveuses enceintes au jour J8/Total des Femelles receveuses transférées	Nombre de sites d'implantation /Nbre d'embryons transférés dans des femelles receveuses enceintes (%)	Nombre de blastocystes implantés / nombre de femelles receveuses
Contrôle	Synchrone	5/6	15 / 54 (27,8%)	9/9
Parthénotes	Synchrone	8/20	17 / 78 (21,8%)	0/1
NT	Synchrone	5/16	7 / 91 (7,7%)	0
Parthénotes	asynchrone	5/9	15 / 44 (34,1%)	3/3
NT	asynchrone	6/13	12/ 59 (20.3%)	1/7

Tableau 3. Développement <i>in vivo</i> d'embryons reconstitués de lapin par transfert nucléaire somatique			
Type de femelles receveuses	Synchrone	Asynchrone (-16h)	Asynchrone (-22h)
Stade des embryons	1-cellule	1-cellule	4-cellules
Nombre d'embryons reconstitués	554	523	775
[Nombre de réplicats]	[19]	[18]	[27]
Nombre d'embryons fusionnés	427	346	612
[% provenant d'embryons reconstitués]	[77.1]	[66.2]	[79.0]
Nombre total transférés	367	346	371
[% provenant d'embryons fusionnés]	[100.0]	[100.0]	[60.6]
Nombre de femelles receveuses transférées	19	18	27
Nombre de femelles receveuses enceintes au jour J14 [de femelles transférées]	0	0	10 [37.0]
Nombre de femelles receveuses ayant mis bas [% de femelles transférées]	0	0	4* [14.8]
Nombre de lapereaux nés			6
[% d'embryons transférés]			[1.6]
Nombre de lapereaux vivants au moment du sevrage			4
Poids moyens des lapereaux à la naissance (en gr)			65 ± 20 ⁺

* avortements entre les jours J15 et J29 de la grossesse (13 cotylédons et fœtus dégénérés ont été récupérés)

+ poids moyens des lapereaux à la naissance dans l'animalerie des inventeurs, pour des portées de nombre équivalent : 55.8gr ± 17.0

REFERENCES

- Adenot et al. (1997) *Mol. Reprod. Dev.* **46**, 325-336.
- Baguisi et al. (1999) *Nature Biotechnol.* **17**, 456-461.
- 5 Bromhall et al. (1975) *Nature* **258**, 719-722.
- Campbell et al. (1996) *Rev. Reprod.* **1**, 40-46.
- Chen et al. (2001) *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1771-1788.
- Denker et al. (1975) *Cytobiol.* **11**, 101-109.
- Denker (1981) *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **53**,
10 123p.
- Dinnyés et al. (2001) *Biol. Reprod.* **64**, 257-263.
- Evans et al. (1981) *Nature* **292**, 154-156
- Fan et al. (1999) *Pathol. Int.* **49**, 583-594.
- Gottschewski et al. (1973) *Schaper, Hannover.*
- 15 Graur et al. (1996) *Nature* **379**, 333-335.
- Hoeg et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**,
11448-11453.
- Kennely et Foote (1965) *J. Reprod. Fert.* **9**, 177-188.
- 20 McGrath et Solter (1984) *Science* **226**, 1317-1319.
- Meyer et al. (1997) *Methods Enzymol.* **283**, 113-128.
- Mitalipov et al. (1999) *Biol. Reprod.* **60**, 821-827.
- Moos et al. (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 739-748.
- Ozil et Huneau (2001) *Development*, **128**, 917-928.
- 25 Polejaeva et al. (2000) *Nature* **407**, 86-90.
- Soloy et al. (1997) *Biol. Reprod.* **57**, 27-35.
- Solter (2000) *Nat. Rev., Genet.* **1**: 199-207.
- Stinnackre et al. (1997) L.M. Houdebine ed.,
Harwood Academic Publishers, pp. 461-463.
- 30 Szöllösi (1966) *Anat. Rec.* **154**, 209-212.

Wakayama et al. (1998) *Nature* **394**, 369-374.

Wakayama et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
96, 14984-14989.

Wells et al. (1999) *Biol. Reprod.* **60**, 996-1005.

5 Whitfield et al. (1985) *Control of Animal Cell*
Proliferation **1**, 331-365.

Wilmot et al. (1997) *Nature* **385**, 810-813.

Yin et al. (2000) *Theriogenology* **54**, 1460-1476.

REVENDICATIONS

1. Méthode de production d'embryons de mammifères
5 non humains comprenant les étapes suivantes :

(a) Evaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de même espèce et du même âge :

10 (i) le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;

15 (ii) le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par
20 activation parthénogénétique,

l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon et ;

(b) transférer un embryon au moins cultivé et/ou
25 manipulé *in vitro* dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T (+/- 25\%T)$;

(c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se
30 développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que le dit premier embryon est cultivé et/ou manipulé *in vitro* au plus tard jusqu'au jour de l'implantation.

5

3. Procédé selon les revendications 1 à 2, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement choisi parmi, le stade 1 cellule, le stade 2 cellules, 10 le stade 4 cellules, le stade 8 cellules, le stade 16 cellules, le stade morula, le stade blastocyste.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est 15 réalisée au stade blastocyste.

5. Procédé selon la revendication 1 à 4, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination de l'asynchronie de développement T est 20 réalisée par comptage cellulaire.

6. Procédé selon les revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la dite asynchronie de développement T est d'au moins 15 heures.

25

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisée en ce que la dite asynchronie de développement T est de 24 heures.

30

8. Procédé selon les revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le dit embryon transféré à

l'étape b) est cultivé dans les mêmes conditions que le dit premier embryon.

9. Procédé selon les revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule.

10. Procédé selon les revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le dit embryon transféré à l'étape b), est au stade 2 cellules.

11. Procédé selon les revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le dit embryon, transféré à étape (b), est au stade 4 cellules.

15

12. Procédé selon les revendications 1 à 11 caractérisée en ce que le dit embryon transféré se développe en fœtus.

20 13. Procédé selon la revendication 12 caractérisée en ce que le dit fœtus se développe en nouveau-né.

14. Procédé selon les revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique.

25 15. Procédé selon les revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

30

16. Procédé selon les revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

5

17. Procédé selon les revendications 1 à 16, caractérisée en ce que le dit mammifère est sélectionné parmi les rongeurs, les lagomorphes, les ongulés, les équidés, les primates, excepté l'homme.

10

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit mammifère est un rongeur sélectionné parmi la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde.

15

19. Procédé selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit ongulés est sélectionné parmi les bovins, les ovins, les caprins, les porcins.

20. Procédé selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit lagomorphe est le lapin.

21. Embryon de mammifère excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

22. Embryon de mammifère transgénique excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

23. Embryon de mammifère, excepté l'homme, reconstitué *in vitro* obtenu par transfert nucléaire, et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, ou cellules
5 dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

24. Descendance du dit mammifère adulte selon la
10 revendications 21 à 23.

25. Procédé *in vitro* de clonage de mammifère par transfert nucléaire comprenant ou incluant un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.
15

26. Procédé de production d'embryons de lapin comprenant les étapes suivantes :

- a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de lapin du même âge :
20
- le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal
25 pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;
 - le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec
30 une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter

l'ovulation, le second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ;

5 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ; et

10 b) transférer un embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro*, pas plus âgé que le stade blastocyste dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T$ ($\pm 25\%T$) ;

15 c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement compris entre les 20 jours J1 et J7 *post coïtum*.

25 28. Procédé selon la revendication 27, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée au jours J5 *post coïtum*.

29. Procédé selon les revendications 26 à 28, caractérisée en ce que la dite asynchronie de développement T est de 23 heures $\pm 25\%$.

30 30. Procédé selon les revendications 26 à 29, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique.

31. Procédé selon les revendications 26 à 29, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

32. Procédé selon les revendications 26 à 29, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

33. Procédé selon les revendications 26 à 32, caractérisée en ce que le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule.

34. Embryon de lapin et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte, ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 26 à 33.

35. Embryon de lapin transgénique et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 26 à 33.

36. Embryon de lapin reconstitué *in vitro* obtenu par transfert nucléaire et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte, ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 26 à 33.

37. Descendance du dit lapin adulte selon la revendications 34 à 36.

38. Procédé *in vitro* de clonage de lapin par
5 transfert nucléaire comprenant ou incluant un procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 33.

39. Procédé *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprenant les étapes de :

10 a) insertion d'une cellule donneuse de lapin ou d'un noyau de cellule donneuse de lapin dans un ovocyte énucléé de lapine dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;

b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à
15 l'étape a) ;

c) transfert dudit embryon reconstitué dans une lapine porteuse, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus, et éventuellement en nouveau né ; et

20 caractérisé en ce que le procédé comprend ou inclut un procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 33.

40. Procédé selon la revendication 39 caractérisée
25 en ce que le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par fusion de la cellule donneuse et du cytoplasme receveur.

41. Procédé selon la revendication 39 caractérisée
30 en ce que le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par micro-injection du noyau donneur dans le cytoplasme receveur.

42. Procédé selon la revendication 39 caractérisée en ce que la dite phase d'activation au cours de la culture *in vitro* est réalisée par adjonction
5 simultanée, successive ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique.

10 43. Procédé *in vitro* de clonage de mammifère, non humain, comprenant les étapes de :

a) insertion d'une cellule donneuse ou d'un noyau de cellule donneuse dans un oocyte énucléé de mammifère de la même espèce ou d'une espèce
15 différente de celle de la cellule donneuse, dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;

b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a) ;

20 c) transfert dudit embryon reconstitué dans une femelle porteuse de mammifère, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus,

caractérisé en ce que la dite activation est réalisée par adjonction simultanée, successive ou décalée dans
25 le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique.

30 44. Procédé selon la revendication 43 caractérisé en ce que le dit mammifère est sélectionné parmi le lapin, les rongeurs, notamment le rat, la souris, et

parmi les bovins, les ovins, les caprins, le porcins, les équidés, les primates, à l'exception de l'homme.

45. Procédé selon la revendication 42 à 44
5 caractérisé en ce que le dit inhibiteur de protéine kinase est le 6-DMAP et le dit inhibiteur de la synthèse protéique est la cycloheximide (CHX).

46. Procédé de production d'une protéine
10 recombinante par un animal transgénique comprenant l'étape de production d'un embryon de mammifère non humain selon les revendications 1 à 20.

47. Procédé de production d'une protéine
15 recombinante par un lapin transgénique comprenant l'étape de production d'un embryon de lapin selon les revendications 26 à 33.

48. Utilisation d'un animal transgénique
20 susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 1 à 20 ou d'un lapin transgénique susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 26 à 33 comme modèle d'étude de pathologies humaines.

25

49. Utilisation d'un animal transgénique
susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 1 à 20 ou d'un lapin transgénique susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les
30 revendications 26 à 33 pour la production de protéines recombinantes.

50. Utilisation selon la revendication 49 caractérisée en ce que la dite protéine recombinante est produite dans le lait de l'animal transgénique.

1 / 4

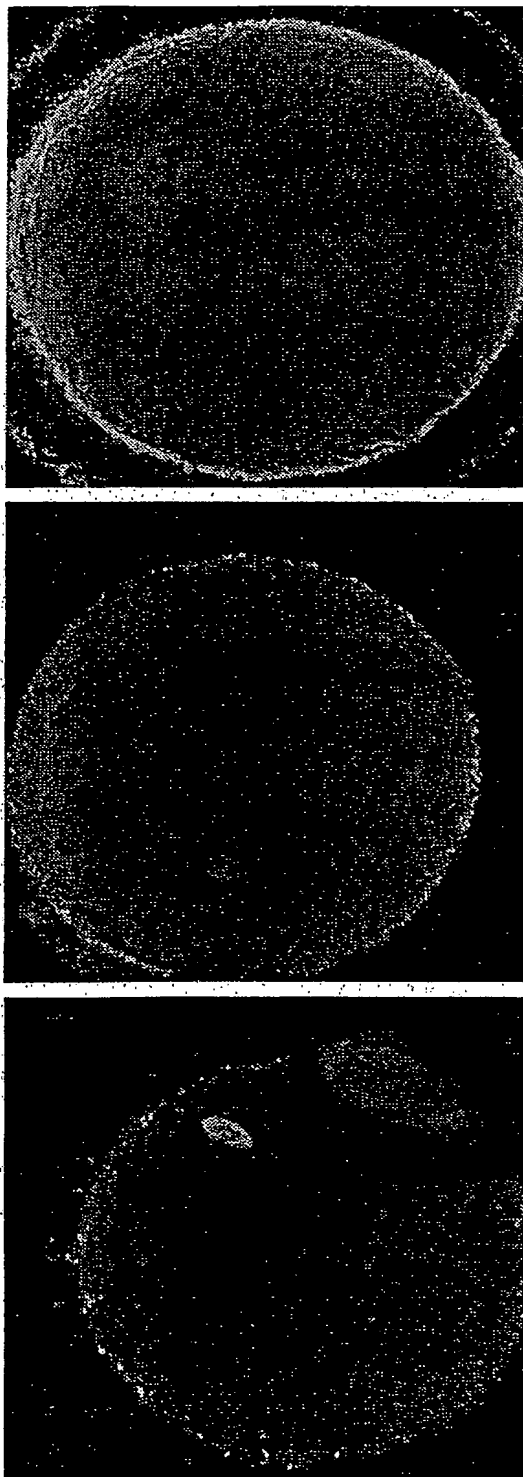


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

2 / 4

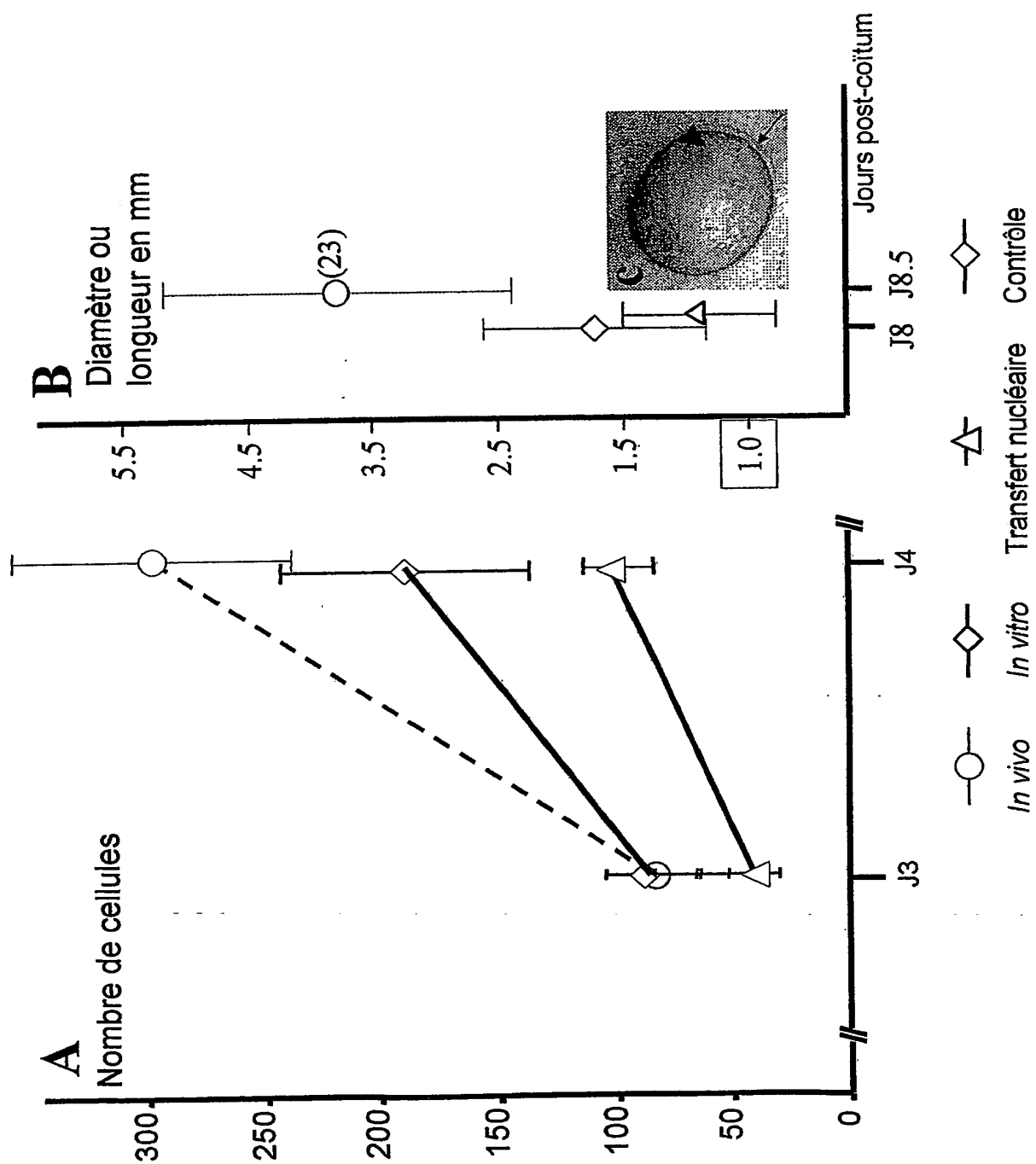


Figure 2

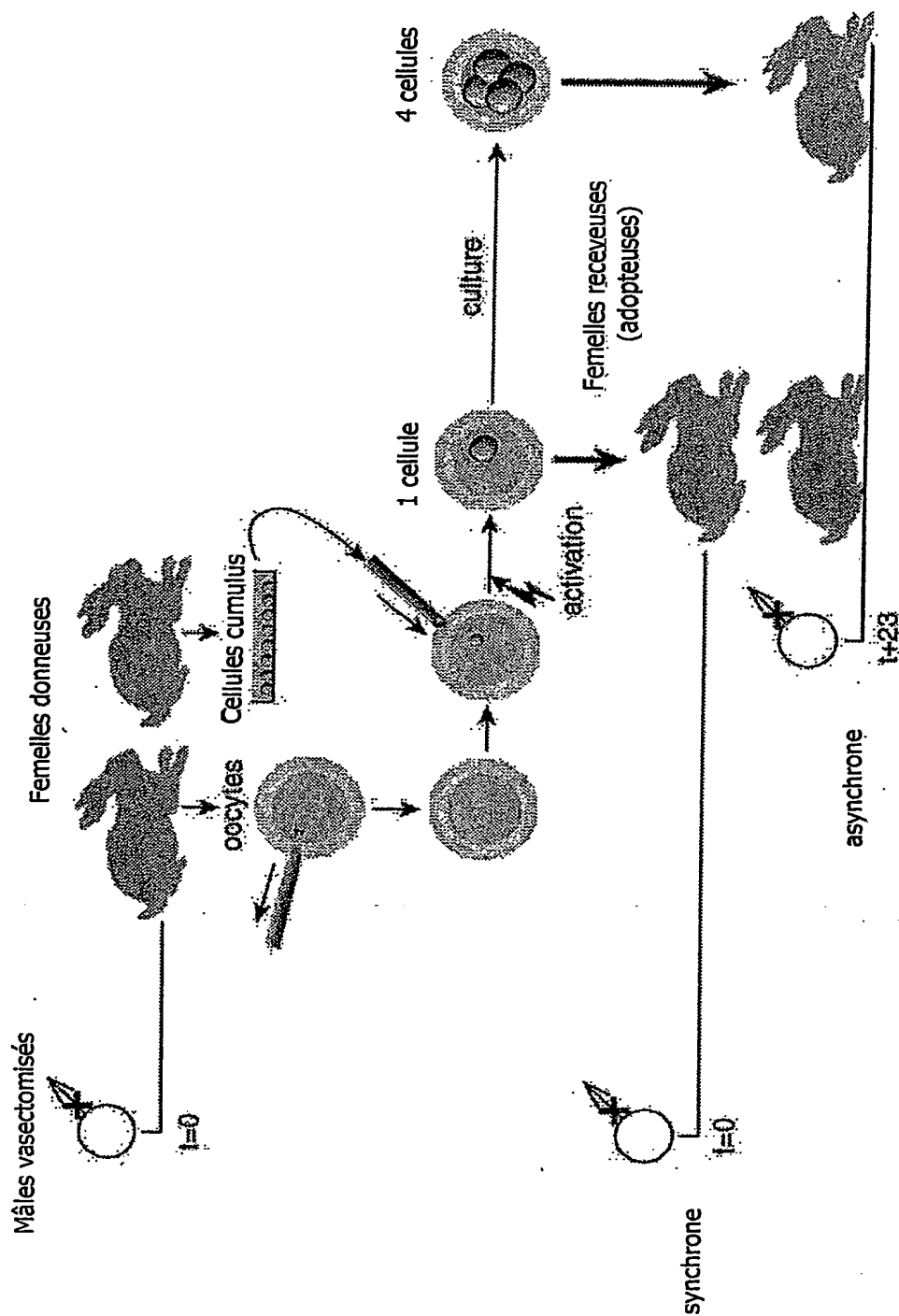


Figure 3

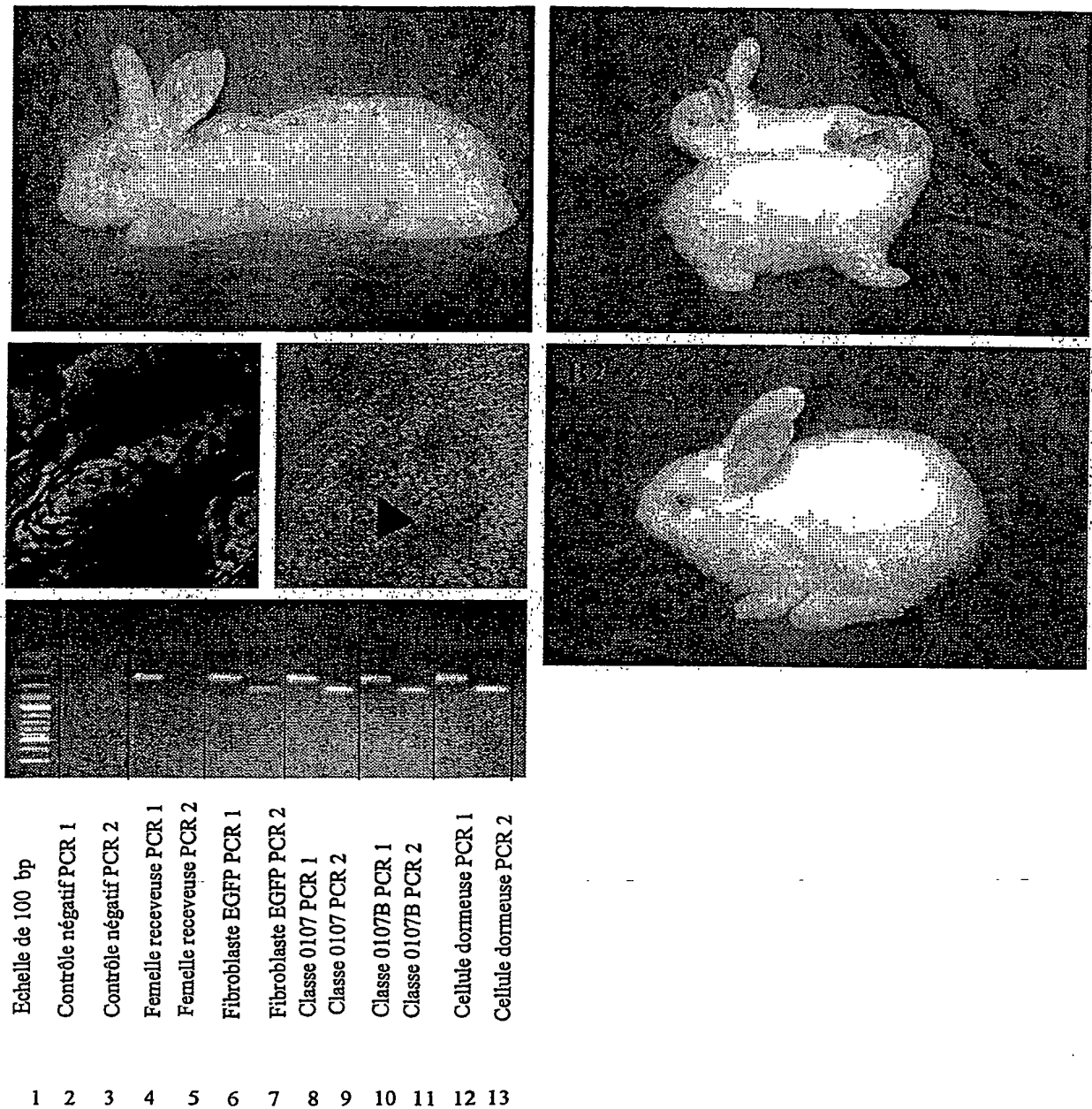


Figure 4

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut National de la Recherche Agronomique - INRA

<120> Procédé de clonage nucléaire chez le lapin et utilisations

<130> D19857

<140>

<141>

<150> FR 02/00 268

<151> 2002-01-10

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce sens du marqueur GFP (green fluorescence protein).

<400> 1

gagtttggat cttggttcat 20

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce antisens du marqueur GFP (green fluorescence protein).

<400> 2

ggcacgggca gcttgccggt gg 22

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce sens de l'exon 10 du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator).

<400> 3

ttttcctgga tcatgcctgg cac 23

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce
antisens de l'exon 10 du gène CFTR (cystic
fibrosis transmembrane regulator).

<400> 4

ctacctgtag cagcttacc a

21

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ D'COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 juillet 2003 (24.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/059053 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/00, A01K 67/027

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/000064

(22) Date de dépôt international :
10 janvier 2003 (10.01.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/00268 10 janvier 2002 (10.01.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université,
F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CHESNE,
Patrick [FR/FR]; 12, square Delacroix, F-78960 Voisins
le Bretonneux (FR). ADENOT, Pierre [FR/FR]; 6, rue
de Savigny, F-91390 Morsang sur Orge (FR). RENARD,
Jean-Paul [FR/FR]; 72, Rue Julien, F-92170 Vanves (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; 20, rue de
Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

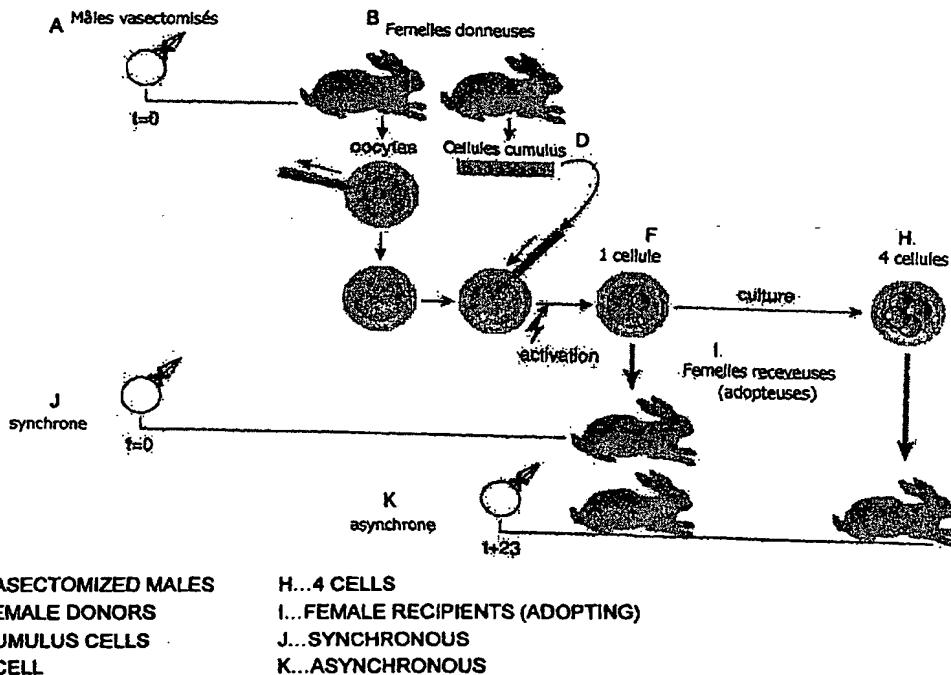
(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: RABBIT NUCLEAR CLONING METHOD AND USES THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE CLONAGE NUCLEAIRE CHEZ LE LAPIN ET UTILISATIONS



(57) Abstract: The invention concerns a method for producing non-human mammal embryos, in particular rabbit by nuclear cloning. The invention also concerns the mammals obtained and their uses.

[Suite sur la page suivante]

BEST AVAILABLE COPY



eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

1 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 7

C12N15/00 A01K67/02/

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 7

7 A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEGELE-HARTUNG C; FISCHER B; BEIER H M: "DEVELOPMENT OF PREIMPLANTATION RABBIT EMBRYOS AFTER IN-VITRO CULTURE AND EMBRYO TRANSFER AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY" ANAT REC., vol. 228, no 1, january 1988 (1988-01) pages 31-42, XP008018995 page 35, column 2, paragraph 3; figure 1	1-12, 17, 20-22, 26, 27, 29, 34, 35
Y	----- -/-	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 August 2003 (07.08.03)

Date of mailing of the international search report

04 December 03 (04.12.03)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 41209 A (SCHOONJANS LUC ;LEUVEN RES & DEV VZW (BE); MOREADITH RANDALL (US)) 6 novembre 1997 (1997-11-06)	1-4,6,7
Y	page 9, alinéa 4; revendications	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
X	----- SCHOONJANS L ET AL: "PLURIPOTENTIAL RABBIT EMBRYONIC STEM (ES) CELLS ARE CAPABLE OF FORMING OVERT COAT COLOR CHIMERAS FOLLOWING INJECTION INTO BLASTOCYSTS" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, LISSS, NEW YORK, NY, US, vol. 45, no. 4, 1 décembre 1996 (1996-12-01), pages 439-443, XP000645114 ISSN: 1040-452X	1,2,11, 17,20, 26,34,35
Y	page 440, colonne 1, alinéa 4	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
X	----- YIN, X.YJ. ET AL.: "Development of rabbit parthenogenetic oocytes and nuclear-transferred oocytes receiving cultured cumulus cells" THERIOGENOLOGY, vol. 54, 2000, pages 1469-1476, XP002219250	21,23, 30,36
Y	cité dans la demande le document en entier	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DINNYES A, DAI Y, BARBER M, LIU L, XU J, ZHOU P, YANG X.: "Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation." BIOL REPROD, vol. 64, no. 1, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 257-263, XP008009814 cité dans la demande	21
Y	le document en entier	1-4, 8-12,14, 16,19, 20, 22-24, 32,34-38
Y	----- GILES J R; FOOTE R H: "Rabbit blastocyst: Allocation of cells to the inner cell mass" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol. 41, no. 2, 1995, pages 204-211, XP008018988 page 208, colonne 1 page 210, colonne 1, dernier alinéa	1-4, 8-12,14, 16,19, 20, 22-24, 32,34-38
X	----- FAN J, CHALLAH M, WATANABE T.: "Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives." PATHOL INT, vol. 49, no. 7, juillet 1999 (1999-07), pages 583-594, XP000941114 cité dans la demande le document en entier	48-50
X-	----- COLLAS P ET AL: "FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF NUCLEAR TRANSPLANTATION IN THE RABBIT EMBRYO" BIOLOGY OF REPRODUCTION, SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 43, no. 5, 1 novembre 1990 (1990-11-01), pages 877-884, XP000607321 ISSN: 0006-3363 page 878, colonne 2, alinéa 4 ----- -/--	1,21,23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00064

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STINNAKRE, M.G. , MASSOUD M. VIGLIETTA C. ET HOUDEBINE L.M.: TRANSGENIC ANIMALS : GENERATION AND USE. L:M: HOUDEBINE ED., no. IV C, 1997, pages 461-463, XP001089698 harwood academic publishers cité dans la demande	49,50
Y	le document en entier	20-23, 48,50
A	----- CAMPBELL KH, ALBERIO R, LEE JH, RITCHIE WA.: "Nuclear transfer in practice." CLONING STEM CELLS. 2001;3(4):201-8., XP008009809 cité dans la demande page 203, colonne 2, alinéa 2	39
T	----- CHESNE P, ADENOT PG, VIGLIETTA C, BARATTE M, BOULANGER L, RENARD JP.: "Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells." NAT BIOTECHNOL 2002 APR;20(4):366-9, XP002219252 le document en entier -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00064

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention includes a technical feature, namely the step of transferring an embryo into the uterus of a receiving female, which constitutes a surgical method applied to the animal body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see following sheet PCT/ISA/210 further information

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-42, 46-50

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims 1-42, 46-50

Method for producing non-human mammalian embryos, comprising the steps of: (a) estimating and/or determining developmental asynchronism (T) between two embryos of the same species and the same age, wherein (i) the first embryo is produced by crossing a preferably vasectomised male at time t_0 with a female that has preferably undergone an ovulation-increasing hormone treatment, said first embryo being at least cultured and/or engineered *in vitro*; and (ii) the second embryo is produced by crossing a fertile male at time t_0 with a female that has preferably undergone an ovulation-increasing hormone treatment, said second embryo having been fertilised normally or obtained by parthenogenetic activation; and wherein the estimation and/or determination takes place at the latest on the date of the uterine implantation of said second embryo; and (b) transferring an embryo that has at least been cultured and/or engineered *in vitro* into the uterus of the receiving female crossed with a vasectomised male at time $t = t_0 + T$ ($\pm 25\% T$); and (c) optionally allowing said embryo transferred in step (b) to implant itself and develop in the uterus of said receiving female; non-human mammalian embryo and/or foetus, new-born, adult mammal or the offspring thereof, or cells derived therefrom, produced by means of said method; use of a transgenic non-human mammal obtained by means of such a method as a model for the study of human diseases.

2. Claims 43-45

Method for *in vitro* cloning of a non-human mammal, comprising the steps of:

- (a) inserting a donor cell or donor cell nucleus into an enucleated oocyte from a mammal of the same species or a species different from that of the donor cell, under conditions that enable a reconstituted embryo to be obtained;
- (b) activating the reconstituted embryo obtained in step (a); and

(c) transferring said reconstituted embryo into a female carrier mammal so that the reconstituted embryo develops into a foetus, characterised in that said activation is achieved by the simultaneous, consecutive or staggered addition of at least one protein kinase inhibitor and at least one protein synthesis inhibitor to the culture medium of said reconstituted embryo.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/00064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741209	A	06-11-1997	
		AU 2892997 A	19-11-1997
		CA 2252524 A1	06-11-1997
		CN 1217746 A	26-05-1999
		WO 9741209 A1	06-11-1997
		EP 0907722 A1	14-04-1999
		JP 2000508919 T	18-07-2000
		US 6103523 A	15-08-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00064

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/00 A01K67/027

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A01K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HEGELE-HARTUNG C; FISCHER B; BEIER H M: "DEVELOPMENT OF PREIMPLANTATION RABBIT EMBRYOS AFTER IN-VITRO CULTURE AND EMBRYO TRANSFER AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY" ANAT REC., vol. 220, no. 1, janvier 1988 (1988-01), pages 31-42, XP008018995	1-12, 17, 20-22, 26, 27, 29, 34, 35
Y	page 35, colonne 2, alinéa 3; figure 1	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

07 August 2003 (07.08.03)

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04 December 03 (04.12.03)

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040-Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00064

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 41209 A (SCHOONJANS LUC ; LEUVEN RES & DEV VZW (BE); MOREADITH RANDALL (US)) 6 novembre 1997 (1997-11-06)	1-4, 6, 7
Y	page 9, alinéa 4; revendications	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
X	----- SCHOONJANS L ET AL: "PLURIPOTENTIAL RABBIT EMBRYONIC STEM (ES) CELLS ARE CAPABLE OF FORMING OVERT COAT COLOR CHIMERAS FOLLOWING INJECTION INTO BLASTOCYSTS" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, LISSS, NEW YORK, NY, US, vol. 45, no. 4, 1 décembre 1996 (1996-12-01), pages 439-443, XP000645114 ISSN: 1040-452X	1, 2, 11, 17, 20, 26, 34, 35
Y	page 440, colonne 1, alinéa 4	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
X	----- YIN, X.YJ. ET AL.: "Development of rabbit parthenogenetic oocytes and nuclear-transferred oocytes receiving cultured cumulus cells" THERIOGENOLOGY, vol. 54, 2000, pages 1469-1476, XP002219250	21, 23, 30, 36
Y	cité dans la demande le document en entier	1-4, 8-17, 20-26, 30-42, 48-50
	----- -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 03/00064

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DINNYES A, DAI Y, BARBER M, LIU L, XU J, ZHOU P, YANG X.: "Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation." BIOL REPROD, vol. 64, no. 1, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 257-263, XP008009814 cité dans la demande	21
Y	le document en entier	1-4, 8-12,14, 16,19, 20, 22-24, 32,34-38
Y	----- GILES J R; FOOTE R H: "Rabbit blastocyst: Allocation of cells to the inner cell mass" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol. 41, no. 2, 1995, pages 204-211, XP008018988 page 208, colonne 1 page 210, colonne 1, dernier alinéa	1-4, 8-12,14, 16,19, 20, 22-24, 32,34-38
X	----- FAN J, CHALLAH M, WATANABE T.: "Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives." PATHOL INT, vol. 49, no. 7, juillet 1999 (1999-07), pages 583-594, XP000941114 cité dans la demande le document en entier	48-50
X	----- COLLAS P-ET AL: "FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF NUCLEAR TRANSPLANTATION IN THE RABBIT EMBRYO" BIOLOGY OF REPRODUCTION, SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 43, no. 5, 1 novembre 1990 (1990-11-01), pages 877-884, XP000607321 ISSN: 0006-3363 page 878, colonne 2, alinéa 4 ----- -/--	1,21,23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00064

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	STINNAKRE, M.G. , MASSOUD M. VIGLIETTA C. ET HOUDEBINE L.M.: TRANSGENIC ANIMALS : GENERATION AND USE. L:M: HOUDEBINE ED., no. IV C, 1997, pages 461-463, XP001089698 harwood academic publishers cité dans la demande	49,50
Y	le document en entier	20-23, 48,50
A	----- CAMPBELL KH, ALBERIO R, LEE JH, RITCHIE WA.: "Nuclear transfer in practice." CLONING STEM CELLS. 2001;3(4):201-8., XP008009809 cité dans la demande page 203, colonne 2, alinéa 2	39
T	----- CHESNE P, ADENOT PG, VIGLIETTA C, BARATTE M, BOULANGER L, RENARD JP.: "Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells." NAT BIOTECHNOL 2002 APR;20(4):366-9, XP002219252 le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 03/00064

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
L'invention comprend un élément technique à savoir l'étape consistant à transférer un embryon dans l'utérus d'une femelle receveuse qui constitue une méthode chirurgicale appliquée au corps animal.
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}
1-42, 46-50

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-42, 46-50

Méthode de production d'embryons de mammifères non humains comprenant les étapes suivantes : a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de même espèce et de même âge :

- (i) le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, ledit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé in vitro;
- (ii) le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, ledit second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique,

l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine dudit second embryon et,

- (b) transférer un embryon au moins cultivé et/ou manipulé in vitro dans l'utérus de la femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T (+/- 25\%T)$;
- (c) facultativement, laisser ledit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de ladite femelle receveuse; embryon de mammifère excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte ou leur descendance, ou cellules dérivés de ceux-ci, produits par ledit procédé; utilisation d'un mammifère transgénique excepté l'homme, obtenu par un tel procédé comme modèle d'étude de pathologies humaines.

2. revendications: 43-45

Procédé in vitro de clonage de mammifère non humain
comprenant les étapes de :

- a) insertion d'une cellule donneuse ou d'un noyau de cellule donneuse dans un oocyte énucléé de mammifère de la même espèce ou d'une espèce différente de celle de la cellule donneuse, dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué;
- b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a);
- c) transfert dudit embryon reconstitué dans, une femelle porteuse de mammifère de sorte que l'embryon reconstitué se développe en fœtus, caractérisé en ce que ladite activation est réalisée par adjonction simultanée, successive ou décalée dans le temps, au milieu de culture dudit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique;

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00064

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9741209 A	06-11-1997	AU 2892997 A	19-11-1997
		CA 2252524 A1	06-11-1997
		CN 1217746 A	26-05-1999
		WO 9741209 A1	06-11-1997
		EP 0907722 A1	14-04-1999
		JP 2000508919 T	18-07-2000
		US 6103523 A	15-08-2000
